

CATHEPSIN G-INHIBITING APTAMER

Patent number: JP9216895
Publication date: 1997-08-19
Inventor: FURANTSUPEETAA BURAHITO; KAARUSHIYUTEN SHIYURAA
Applicant: KURINOSUPITARU SPA
Classification:
- **international:** C12N15/11; C12N15/11; (IPC1-7): C07H21/02; A61K31/70; C07H21/04
- **europen:** A61K31/70W; C12N15/11D
Application number: JP19960329169 19961125
Priority number(s): DE19951043750 19951124

Also published as:

EP0775745 (A2)
US5780449 (A1)
EP0775745 (A3)
DE19543750 (A1)
EP0775745 (B1)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP9216895

Abstract of corresponding document: **EP0775745**

Cathepsin G-inhibiting aptamers comprising oligonucleotides selected from the group consisting of the consensus sequences: GGN1-7GGN8-14GGN1-6GGN1-7GGN1-6GG, GGN10-13GGN1-5GGN1-5GGN3-6GGN2-7GG and the sequence

GGGTTGAGGGTGGATTACGCCACGTGGAGCTGGATCCACACATCCAGG

wherein N represents nucleotides and the figures represent the number of possible nucleotides at that site, said cathepsin G-inhibiting aptamers are suggested as medicament.

GGTACCCGGAA TCCGAGCTCC

5' - CCTACGGAAATCCTTACCC-----N

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-216895

(43)公開日 平成9年(1997)8月19日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 H 21/02			C 07 H 21/02	
A 61 K 31/70	AAM		A 61 K 31/70	AAM
	ABE			ABE
	ABG			ABG
	ABJ			ABJ

審査請求 未請求 請求項の数2 FD (全8頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-329169

(22)出願日 平成8年(1996)11月25日

(31)優先権主張番号 19543750.0

(32)優先日 1995年11月24日

(33)優先権主張国 ドイツ (DE)

(71)出願人 591153097

クリノス インドウストリア フアルマコ

ビオロジカ エス. ピ. ア.

イタリア 22079 コモ ヴィラ グアル

ディア ピアッツア 20 セッテンブレ

2

(72)発明者 フランツペーター ブラヒト

ドイツ連邦共和国, デュッセルドルフ

4023, ヒンメルガイスターストラーゼ

336

(72)発明者 カールシュテン シュラー

ドイツ連邦共和国, フレッケン-ケーニグ

スドルフ 50226, ヒュッテンペク 2

(74)代理人 弁理士 森田 憲一

(54)【発明の名称】 カテプシンG阻害アプタマー

(57)【要約】

【課題】 カテプシンG阻害剤及びそれを含有する医薬組成物を提供する。

【解決手段】 カテプシンG阻害アプタマーは、
GGN₁₋₇ GGN₈₋₁₄ GGN₁₋₆ GGN₁₋₇ GGN₁₋₆
GG

(式中、Nはヌクレオチドを表わし、数字は、更なるヌクレオチドの可能な数を表わす)で表されるコンセンサス配列、

GGN₁₀₋₁₃ GGN₁₋₅ GGN₁₋₅ GGN₃₋₆ GGN
2-7 GG

(式中、Nはヌクレオチドを表わし、数字は、更なるヌクレオチドの可能な数を表わす)で表されるコンセンサス配列、及び配列表の配列番号1で表わされる配列からなる群から選んだオリゴヌクレオチドを含む。

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-216895

(43)公開日 平成9年(1997)8月19日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 H 21/02			C 07 H 21/02	
A 61 K 31/70	AAM		A 61 K 31/70	AAM
	ABE			ABE
	ABG			ABG
	ABJ			ABJ

審査請求 未請求 請求項の数 2 FD (全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-329169

(22)出願日 平成8年(1996)11月25日

(31)優先権主張番号 19543750.0

(32)優先日 1995年11月24日

(33)優先権主張国 ドイツ (DE)

(71)出願人 591153097

クリノス インドウストリア・ファルマコ
ピオロジカ エス. ピ. ア.
イタリア 22079 コモ ヴィラ グアル
ディア ピアッツア 20 セッテンブレ
2

(72)発明者 フランツベーター ブラヒト
ドイツ連邦共和国, デュッセルドルフ
4023, ヒンメルガイスター通り
336

(72)発明者 カールシュテン シュラー
ドイツ連邦共和国, フレッケン-ケーニグ
スドルフ 50226, ヒュッテンバク 2

(74)代理人 弁理士 森田 憲一

(54)【発明の名称】 カテプシンG阻害アプタマー

(57)【要約】

【課題】 カテプシンG阻害剤及びそれを含有する医薬
組成物を提供する。

【解決手段】 カテプシンG阻害アプタマーは、
GGN₁₋₇ GGN₈₋₁₄ GGN₁₋₆ GGN₁₋₇ GGN₁₋₆
GG

(式中、Nはヌクレオチドを表わし、数字は、更なるヌ
クレオチドの可能な数を表わす)で表されるコンセンサ
ス配列、

GGN₁₀₋₁₃ GGN₁₋₅ GGN₁₋₅ GGN₃₋₆ GGN
2-7 GG

(式中、Nはヌクレオチドを表わし、数字は、更なるヌ
クレオチドの可能な数を表わす)で表されるコンセンサ
ス配列、及び配列表の配列番号1で表わされる配列から
なる群から選んだオリゴヌクレオチドを含む。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 $GGN_{1-7} GGN_{8-14} GGN_{1-6} GGN_{1-7} GGN_{1-6} GG$

(式中、Nはヌクレオチドを表わし、数字は、更なるヌクレオチドの可能な数を表わす)で表されるコンセンサス配列、

$GGN_{10-13} GGN_{1-5} GGN_{1-5} GGN_{3-6} GGN_{2-7} GG$

(式中、Nはヌクレオチドを表わし、数字は、更なるヌクレオチドの可能な数を表わす)で表されるコンセンサス配列、及び配列表の配列番号1で表わされる配列からなる群から選んだオリゴヌクレオチドを含む、カテプシンG阻害アプタマー。

【請求項2】 請求項1に記載のカテプシンG阻害アプタマーを少なくとも1つ含有する医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、カテプシンG阻害オリゴヌクレオチド及びそれを含有する医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】カテプシンGは、キモトリプシンと同様のセリンプロテアーゼであり、多形核白血球(PMN)のアズール顆粒中に主に存在する。前記酵素は、PMN・脱顆粒の間に放出され、血小板凝集を刺激し、血管壁のプロテオグリカン、糖タンパク質、及びコラーゲンを加水分解する。更に、血液中を循環する細胞、特には白血球を活性化する。更に重要な点は、カテプシンGが、凝固因子(例えば、ファクターV)の活性化、並びにヒト血小板糖タンパク質Ib-IX及びIb/IIIaのタンパク質分解活性化に関与していることである。カテプシンGの血小板刺激作用は、トロンビンのそれと似ているが、別個の機構(受容体)によりもたらされる点でそれとは異なる。加えて、カテプシンG放出は、細胞壁及び他の組織にダメージを与えることができる。

【0003】加えて、カテプシンGに関して更に多くの効果が公知であり、従って、要約すれば、カテプシンGが、PMNの脱顆粒の間に放出され、生物学的に重要なタンパク質を分解し、そして、炎症及び虚血の発生の間の組織ダメージに寄与することを指摘することができる。カテプシンGの効果に関する従来の発見は、カテプシンの阻害が、炎症発生及び前凝固(procagulant)症状の治療及び予防に適するという仮説を導く。

【0004】公知のカテプシンGアンタゴニストは、タンパク質エグリンB及びC(Handbook of Enzyme Inhibitors, 第2版, Chemic Weinheim出版, 1993年)であるが、医薬として経口的に使用することができず、免疫学的合併症の重大なリスクを伴う。更に、阻害剤(例え

ば、ヘパリン)が選択的でなく、しかも、他の酵素(例えば、トロンビン)を阻害する。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の課題は、カテプシンG阻害剤及びそれを含有する医薬組成物を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】前記課題は、 $GGN_{1-7} GGN_{8-14} GGN_{1-6} GGN_{1-7} GGN_{1-6} GG$

(式中、Nは更なるヌクレオチドを表わし、その数字は、その位置における可能なヌクレオチドの数を表わす)で表されるコンセンサス配列、

$GGN_{10-13} GGN_{1-5} GGN_{1-5} GGN_{3-6} GGN_{2-7} GG$

(式中、Nは更なるヌクレオチドを表わし、その数字は、その位置における可能なヌクレオチドの数を表わす)で表されるコンセンサス配列、及び配列表の配列番号1で表わされる配列からなる群から選んだオリゴヌクレオチドを含む、カテプシンG阻害アプタマー(cathepsin G-inhibiting aptamer)によって解決される。

【0007】

【発明の実施の形態】オリゴヌクレオチドの固定された要素としてのGペア(G-pairs)を検討することによって、コンセンサス配列を確認した。調製実施例に記載のオリゴヌクレオチドペールを調製した後に、選ばれたプライマー配列を5'及び3'末端に有するオリゴヌクレオチドの共通する構造的要素として、Gペアを見出した。これは、オリゴヌクレオチドの一次構造の単純な比較によって見出された。Gペアは、三次構造の最適なエネルギー構造をもたらし、前記構造は、エネルギーの点において、適当なワトソン-クリック塩基対よりも顕著に有利である。前記の固定された点を基準として、「支持要素」の間の塩基の数を確認することができた。これに関連して、Nature, 第355巻(1992年), 第564頁～第566頁に開示されている。この点に関して、アプタマーを、いくつかの例外を除いて、関係するコンセンサス配列によって表わされる2つのグループに分けることができる。見つかったコンセンサス配列の例外は、指摘されたループの1つの先端の延長部分の点で、コンセンサス配列により表わされるアプタマーと異なる。表1から明らかなように、これは、カテプシンG阻害剤としてのオリゴヌクレオチドの機能に影響を与えない。その理由により、コンセンサス配列の確認において前記配列を考慮にいれなかった。従って、コンセンサス配列は、最小の長さで最高の効果を与える配列を表わす。コンセンサス配列は、阻害剤としての作用と配列の長さとを考慮した最適な配列として確認された。

【0008】また、前記配列は、より長いオリゴヌクレ

オチド（例えば、90ヌクレオチド）の成分としても有効である。

【0009】本発明のアプタマーは、純粋なカテプシンGに関して強力な阻害を示す。洗浄したヒト血小板の凝集のカテプシンG-誘発性刺激は、カテプシンGアプタマーの濃度に依存して阻害される。また、本発明のアプタマーは、PMNからのO₂ラジカルのfMLP-刺激性放出も阻害する。

【0010】胃腸管において、本発明のアプタマー又はオリゴヌクレオチドの変性は期待されないので、経口投与することが可能な医薬組成物として提供される。更に、本発明のアプタマーは、特に、好中性顆粒球が活性化される病気の治療用医薬組成物として提供される。前記病気又は病的状態には、炎症及び前凝固（procoagulatory）症状が含まれる。具体的に指摘すれば、喘息、気管支炎、骨及び関節病、並びにリュウマチ症状である。他に挙げると、血管内凝固障害の治療及

5' -

- 1) GGTACCCGGA TCCGAGCTCC ACGTGGGGC ACGGACTGG (配列番号2)
- 2) GGTCTGGTG CTCTCGTGG AGTCCGGATC CGGGG (配列番号3)
- 3) GGTGAGGCT AGCTAGCGAG CGGTAGTCTA GAACCTTAGG CGTGGTGAGG (配列番号4)
- 4) GGACCTTAAG GGCACAACTG AGGAAATGGA GGTAGG (配列番号5)
- 5) GGCACGGTTAC CAGGGTGGAT GGTACCTAGG (配列番号6)
- 6) GGRGGGTTAG TTACAAACGT AGGSACGTGG RGCTCGGATY YCSGG (配列番号7)
- 7) GGTSCGGTS CCCYACGGTC GACSCTAGCG TAGGAAACSC CGGCTAGG (配列番号8)
- 8) GGTGGACCT ACSAGGKTTA CYKGGAWYCS AGGYCCAMST GG (配列番号9)
- 9) GGCTGGRTYC CSAGSTYCAC CGKGGGRGGR CAAMAATGGG GG (配列番号10)
- 10) GGTCGAGGTA GCTGCGAGCT GGGTGGCGTG GTGAGG (配列番号11)
- 11) GGTGAGACGG GCATGTTGTT GGBATTGGT TGATGCTCCA CGTGGAGCTC GG (配列番号12)
- 12) GGTGTGTACA CACATTGGCG GTGGATGAGG TCGG (配列番号13)
- 13) GGGGCGCAGT TAGGTGTGAG GTGTGAGGTC ACGTGGGCTC GG (配列番号14)
- 14) GGATGATATC CTCATGGCAG GGAATGGTGC GGGCTCCAGG (配列番号15)
- 15) GGATTTGATA TGGCAGGGAA TGGTGGGGC TTCCCAAGG (配列番号16)

【0013】本発明のオリゴヌクレオチドは、DNA-又はRNA-オリゴヌクレオチドの形状であることができる。配列を改変して、半減期を長くすることができる。本発明においては、例えば、2'-フルオロウラシル若しくは2'-フルオロシトシンで改変されたヌクレオチド、又は2'-アミノ-CTP及び2'-アミノ-UTPをはじめとするヌクレオチドが、前記目的に適している。また、オリゴヌクレオチドをリン酸チオエートで安定化することもできる。

【0014】本発明において、アプタマーの投与に適する医薬組成物の形状は、注射可能であり、経口投与可能であり、そして、局部的に有効な製剤である。経口投与可能であり、局部的に有効な医薬組成物には、特に、錠剤、丸薬、カプセル、及び本発明のアプタマーの溶液又は懸濁液の形状のシロップ、並びに容易に広がる製剤が

び予防、特には、敗血症ショック及び関連疾患に関連する、血栓症並びに動脈及び静脈血管症（vascular diseases）（血小板のPMN誘発性活性化、血漿の凝集系、及び血管ダメージを含む）である。前記病気は、特には、心筋梗塞、末梢血管閉塞、並びに静脈系の炎症性及び血栓性疾患、並びに虚血性心筋のカテプシンG依存性組織破壊に起因する再灌流ダメージである。最後に、本発明のアプタマーは、アルツハイマー症の進行の予防及び阻害用に提供される。

【0011】本発明のアプタマーの好適態様を以下に説明するが、それらはすべて、所望の作用を有する。アプタマー1～アプタマー11は、先に特定した第1のコンセンサス配列に含まれ、そして、アプタマー12～アプタマー15は、先に特定した第2のコンセンサス配列に含まれる。

【0012】

3' -

- 1) GGTACCCGGA TCCGAGCTCC ACGTGGGGC ACGGACTGG (配列番号2)
- 2) GGTCTGGTG CTCTCGTGG AGTCCGGATC CGGGG (配列番号3)
- 3) GGTGAGGCT AGCTAGCGAG CGGTAGTCTA GAACCTTAGG CGTGGTGAGG (配列番号4)
- 4) GGACCTTAAG GGCACAACTG AGGAAATGGA GGTAGG (配列番号5)
- 5) GGCACGGTTAC CAGGGTGGAT GGTACCTAGG (配列番号6)
- 6) GGRGGGTTAG TTACAAACGT AGGSACGTGG RGCTCGGATY YCSGG (配列番号7)
- 7) GGTSCGGTS CCCYACGGTC GACSCTAGCG TAGGAAACSC CGGCTAGG (配列番号8)
- 8) GGTGGACCT ACSAGGKTTA CYKGGAWYCS AGGYCCAMST GG (配列番号9)
- 9) GGCTGGRTYC CSAGSTYCAC CGKGGGRGGR CAAMAATGGG GG (配列番号10)
- 10) GGTCGAGGTA GCTGCGAGCT GGGTGGCGTG GTGAGG (配列番号11)
- 11) GGTGAGACGG GCATGTTGTT GGBATTGGT TGATGCTCCA CGTGGAGCTC GG (配列番号12)
- 12) GGTGTGTACA CACATTGGCG GTGGATGAGG TCGG (配列番号13)
- 13) GGGGCGCAGT TAGGTGTGAG GTGTGAGGTC ACGTGGGCTC GG (配列番号14)
- 14) GGATGATATC CTCATGGCAG GGAATGGTGC GGGCTCCAGG (配列番号15)
- 15) GGATTTGATA TGGCAGGGAA TGGTGGGGC TTCCCAAGG (配列番号16)

含まれる。前記医薬組成物の製造及び用いられるアジュバントは、当業者に公知である。

【0015】

【実施例】図1に、クロモジエニックス社（ドイツ、エッセン）の基質S2545を用いるクロモジエニックアッセイにおける、アプタマー10によるカテプシンG活性の阻害を示す[B100d, 77, (1991) 2379-2388]。カテプシンG活性は、Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Pnaの加水分解を参照することにより測定した。カテプシンGの活性は、濃度に依存して阻害される。最大阻害は、300nMアプタマー濃度で60%に達する。

【0016】図2に、アプタマー10により阻害されるカテプシンG誘発性血小板凝集を示す[B100d, 81, (1993) 2947-2957]。ここでまた、

カテプシンG誘発性効果における濃度依存性の阻害が表される。200 nMのアプタマー濃度で90%阻害レベルが達成される。

【0017】図3に、アプタマーにより阻害されるカテプシンG誘発性血小板凝集の濃度依存性を示す。図2で示した結果がここで実証される。加えて、トロンビン阻害アプタマーによる阻害効果がないことを示すことができる。

【0018】図4に、ヒト血漿でのアプタマーの安定性を示す。ヒト血漿中のブレインキュベーション(15分間まで)中に、アプタマーの活性に重大な低下はみられない。この結果は、血漿中のヌクレアーゼに供せられているにもかかわらず、アプタマーの安定性を示す。

【0019】図1～図4に示すすべてのデータは、n=3の平均値±SDである。これらの生物学的テストにより、最大阻害は約200 nMカテプシンGアプタマーですでに達成されていることが示される。阻害定数IC₅₀は約60～100 nMであり、これによって、K_iがより低いナノモル範囲にあることが予想される。

【0020】更に、アプタマー1、3、5、6、7、9、10、11、14、及び15の阻害効力を決定するために、これらのアプタマーをテストした。ここまでた、このテストの根拠は、基質のC末端を芳香族アミノ酸に分解するカテプシンGの活性におけるこれらのアプタマーの阻害作用であった。前記基質は、サクシニル-L-アラニル-L-プロリル-L-フェニルアラニン-p-ニトロアニリド(Suc-Ala-Pro-Phe-Pna)であった。カテプシンGは、純粹であると仮定した形状で使用した。本発明のアプタマーの存在下におけるカテプシンGの活性の測定を、0.03 Mトリス(pH 7.2)、150 mM-NaCl、5 mM-MgCl₂、及び5 mM-KClで実施した。吸光度の変化を405 nm(2回評価)で測定し、カテプシンGの活性を計算した。表1に、阻害されていないコントロールサンプルの%として、阻害度を示す。

【0021】

【表1】

アプタマー	%阻害	
	実験1	実験2
1	46	45
3	47	49
5	43	41
6	44	42
7	46	49
9	48	48
10	49	50
11	41	37
14	41	40
15	36	32

【0022】調製実施例

1. カテプシンG結合アプタマーの単離のためのインピトロ選抜

ヒトトロンビンに結合して阻害する一本鎖DNAヌクレオチドの単離に関して、NATURE第355巻第564頁～566頁(1992年)に基本的に記載され、特にGene第137巻第25頁～31頁(1993年)に記載されている方法によって、本発明のカテプシンG阻害アプタマー配列を好適に得ることができる。

【0023】1. 1. オリゴヌクレオチドプールの調製

これまで未知の酵素結合配列(アプタマー)の単離用に、互いに異なる充分量の合成オリゴヌクレオチドが必要である。このオリゴヌクレオチドプールは、次の基準、すなわち、(a)少なくとも10¹³の異なる配列、(b)前記オリゴヌクレオチドはポリメラーゼチェーン反応(PCR)法により増幅される必要がある、及び(c)直接的クローニングの可能性を満たす必要がある。ヌクレオチド60個を有する分子において、4塩基A, C, G, Tのそれぞれが各位置を占めることができの場合に、異なるオリゴヌクレオチドの要求量が達成される。

【0024】PCR法による増幅の能力は、規定された配列18塩基を、60塩基ヌクレオチドの5'及び3'末端の両方に連結することにより得られる。制限ヌクレアーゼEcoRI用の、オリゴヌクレオチドの5'プライマー配列内の適当な制限交点(restriction intersection)を挿入することによりなされた場合、直接的クローニングは可能であった。得られた96塩基オリゴヌクレオチドは、示されたすべての要求を満足する。その配列を以下に示す：

5' - CGTACGGAATTGCTAGC----N₆₀-----CACGTGGAGCTCGGATCC -3'

(式中、Nはヌクレオチドを表わす)。前記の18塩基長のプライマー結合試薬の間に60ヌクレオチドが存在する。前記試薬において、可能な塩基のそれぞれは、任意の位置に存在することができる。それにより、約10¹³の異なる配列が提供される。このオリゴヌクレオチドは、HPLC法により精製される。

【0025】1. 2. オリゴヌクレオチドのカテーテンGとのインキュベーション

この調製工程において、DNAオリゴヌクレオチドを標的酵素に結合させ、結合しないオリゴヌクレオチドを、イオン交換クロマトグラフィーにより分離する。最初の工程では、充分量のオリゴヌクレオチドプール(300 μg、すなわち約10nmol相当)を100μgカテーテンGと一緒にインキュベートする。インキュベーション緩衝液(pK7.5)は、30mMトリス-HCl、150mM-NaCl、5mM-KCl、及び5mM-MgCl₂を含有した。インキュベーションは室温で30分間実施し、そのインキュベートの全容量は1mlであった。

【0026】1. 3. イオン交換クロマトグラフィー
続いて、前記インキュベートを1mlハイドロカーチオン交換カラム(ファルマシア)にかけた。カラム材料を予め前記インキュベーション緩衝液でバランスさせた。更に、この工程で使用した装置は、メンブレンポンプ、分光光度計、及び記録装置である。

【0027】4°Cで約25分間更にインキュベートした後、結合していないDNA断片を洗浄除去した(流速1ml/分)。それに対して、DNA断片に結合した、正に帶電したカテーテンGは、カラム材料上に残った。カラム材料に結合したDNA/酵素複合体の溶出は、0.8M-NaCl及び50mMトリス-HCl緩衝液(pH7.8)で行なった(流速0.5ml/分)。DNAを含有していると光度測定により同定された画分を集め、Sambrook, Fritsch及びManiatis, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, Laboratory

Press(1989年)に従って、公知のエタノール/アセテート沈殿にかけた。その容量のエタノールを3回加えた。-20°Cで一晩の沈殿の後、12000×gでサンプルを1時間遠心した(Heraeus Biologe 13)。得られたペレットを乾燥させ、滅菌水50μlで希釈した。以下のポリメラーゼチーン反応はDNA溶液15μlで実施した。従って、1画分で3回までの増幅を実施することができた。

【0028】1. 4. イオン交換クロマトグラフィー

配列

GGGTTGAGGG TGGATTACGC CACGTGGAGC TCGGATCCAC ACATCCAGG

【0033】配列番号: 2

配列の長さ: 39

プライマー5'-CGTACGGAATTGCTAGC-3'(配列番号17)及びプライマー5'-CACGTGGAGCTCGGATCC-3'(配列番号18)で、ポリメラーゼチーン反応を実施した。溶出したDNAの最大増幅の条件は、一連のテストで求め決定した。MgCl₂至適濃度は2mMであり、プライマー至適濃度は1.5μMであった。それに加えて、ポリメラーゼ、緩衝液、及びMgCl₂溶液を含むプリメザイム(PRIMEZYME)キット(Biometra)を使用した。それぞれ、変性温度は94°Cで、プライマーのハイブリダイゼーションの温度は42°Cで、そして、伸長の温度は72°C(1分)であった。ポリメラーゼ1Uの使用で、最大収率を得るのに充分であった。前記サイクルを40回実施した。これらの反応の生成物を、アガロースゲル電気泳動法により分析し、DNA伸長標準品との比較により定量した。続いて、それを沈殿させ、滅菌水に溶かし、熱変性(95°C)により一本鎖形状に変化させた。これがサイクルの最後であり、続いて、DNAをもう一度、前記インキュベーションに移した。

【0029】1. 5. カラム材料へ非特異的に結合するDNA配列の豊富化の回避

カラム材料へ結合する配列の豊富化を防ぐために、最後の3サイクルにおける工程を改良した。DNAをカテーテンGとプレインキュベートせずに、前記酵素をクロマトグラフィーカラムに直接充填した。予めスイッチした更なるカラムを単にカチオン交換材料で充填し、続くDNAの装填(流速0.3ml/分)によりそれらの断片のみがカテーテンGに結合する(最初のカラムのカラム材料とは非特異的に反応しない)ことができるようにならした。

【0030】1. 6. 最後のサイクルの後のPCR生成物のクローニング及び配列決定

最後のサイクルの後、得られたPCR生成物をクレノーポリメラーゼで完全にし、リン酸化を行ない、その混合物をEcoRI制限消化にかけた。続いて、ベクターpUC18への直接クローニングを行なった。その後、配列決定した挿入物内の配列ホモジニーを検索した。得られた配列をコンピュータープログラム(Husar, EMBL Database, ハイデルベルグ)により評価した。

【0031】

【配列表】

【0032】配列番号: 1

配列の長さ: 49

配列の型: 核酸

配列の型: 核酸

配列		
GGTACCCGGA TCCGAGCTCC ACGTGGGGC ACGGACTGG	39	
【0034】配列番号：3	配列の型：核酸	
配列の長さ：35		
配列		
GGTCCTGGTG CTCCCTCGTGG AGTTCCGATC CGGGG	35	
【0035】配列番号：4	配列の型：核酸	
配列の長さ：50		
配列		
GGTCGAGGCT AGCTAGCGAG CGGTAGTCTA GAACCTTAGG CGTGGTGAGG	50	
【0036】配列番号：5	配列の型：核酸	
配列の長さ：36		
配列		
GGACCTTAAG GGCACAACTG AGGAAATGGA GGTAGG	36	
【0037】配列番号：6	配列の型：核酸	
配列の長さ：40		
配列		
GGCGCGAGGT GCACCGTTAC CAGGGTGGAT GGTACCTAGG	40	
【0038】配列番号：7	配列の型：核酸	
配列の長さ：45		
配列		
GGRGGGTTAG TTACAAACGT AGGSACGTGG RGCTCGGATY YCSGG	45	
【0039】配列番号：8	配列の型：核酸	
配列の長さ：48		
配列		
GGTSGCTGGTS CCCYACGGTC GACSGCTAGCG TAGGAAACSC CGGCTAGG	48	
【0040】配列番号：9	配列の型：核酸	
配列の長さ：42		
配列		
GGTGGACGST ACSAGGKTTA CYKGGAWYCS AGGYCCAMST GG	42	
【0041】配列番号：10	配列の型：核酸	
配列の長さ：42		
配列		
GGCTGGRTYC CSAGSTYCAC CGKGGGRGGR CAAMAATGGG GG	42	
【0042】配列番号：11	配列の型：核酸	
配列の長さ：36		
配列		
GGTCGAGGTA GCTGCGAGCT GGGTGGCGTG GTGAGG	36	
【0043】配列番号：12	配列の型：核酸	
配列の長さ：52		
配列		
GGTGAGACGG GCATGTTGTT GGBATTGCGT TGATGCTCCA CGTGGAGCTC GG	52	
【0044】配列番号：13	配列の型：核酸	
配列の長さ：34		
配列		
GGTGTGTACA CACATTGGCG GTGGATGAGG TCGG	34	
【0045】配列番号：14	配列の型：核酸	
配列の長さ：42		
配列		
GGGGCGCAGT TAGGTGTGAG GTGTGAGGTC ACGTGGGCTC GG	42	

【0046】配列番号：15

配列の長さ：40

配列

GGATGATATC CTCATGGCAG GGAATGGTGC GGGCTCCAGG

40

【0047】配列番号：16

配列の長さ：38

配列

GGATTTGATA TGGCAGGGAA TGGTGCGGGC TTCCCGAG

38

【0048】配列番号：17

配列の長さ：18

配列

CGTACGGAAT TCGCTAGC

18

【0049】配列番号：18

配列の長さ：18

配列

CACGTGGAGC TCGGATCC

18

【図面の簡単な説明】

【図1】アプタマー10によるカテプシンG活性の阻害を示すグラフである。

【図2】光透過の増大によって、アプタマー10により阻害されるカテプシンG誘発性血小板凝集を説明するグラフである。

配列の型：核酸

配列の型：核酸

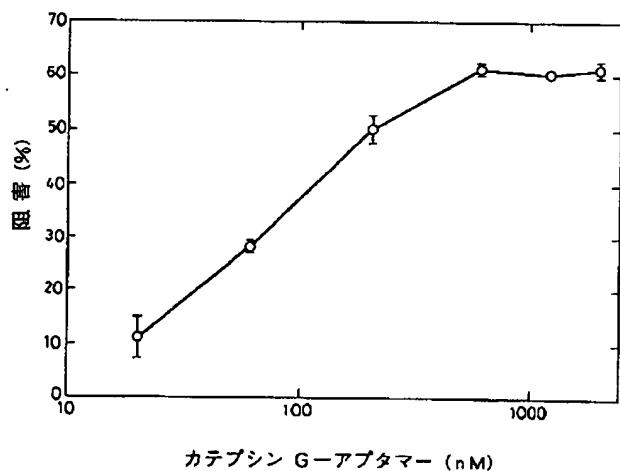
配列の型：核酸

配列の型：核酸

【図3】カテプシンG阻害アプタマーによる、ヒト血小板のカテプシンG誘発性凝集の阻害を示すグラフである。

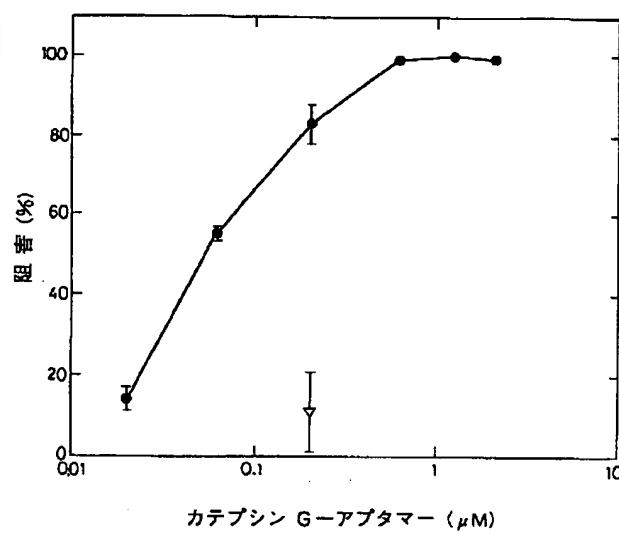
【図4】ヒト血漿中でのDNA-及びRNA-アプタマーの安定性を示すグラフである。

【図1】



○：カテプシン G-アプタマー

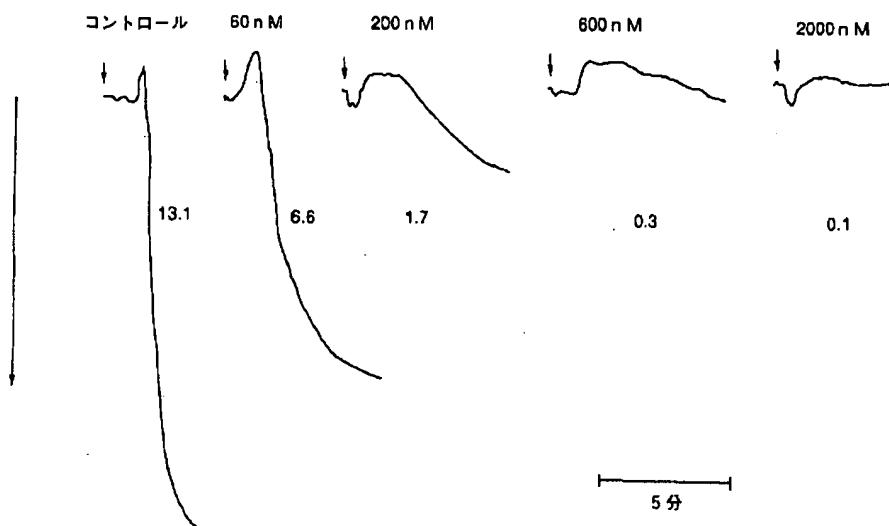
【図3】



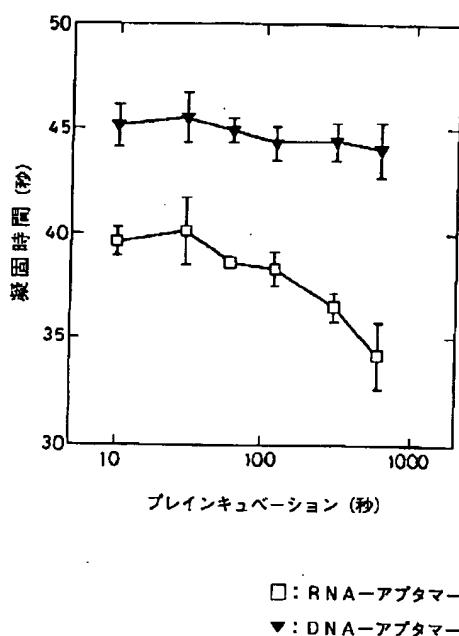
●：カテプシン G-アプタマー

▽：トロンビン アプタマー

【図2】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁶
A 61 K 31/70
C 07 H 21/04

識別記号
A B S
A C B
A C D
A E D

F I
A 61 K 31/70
C 07 H 21/04

技術表示箇所
A B S
A C B
A C D
A E D
Z